

Sjálfmelta og bygging trypsíns I úr Atlantshafsporski (*Gadus morhua*).

Linda Helgadóttir¹, Sigríður Ólafsdóttir¹, Jay W. Fox² og Jón Bragi Bjarnason¹

¹Raunvísindastofnun Háskólans og ²University of Virginia

Vefútgáfa: 16. ágúst 2004

Ágrip Meltingarensímið trypsín er sérín próteasi sem hvatar vatnsrof á peptíðtengjum við amínósýrurnar argínín eða lýsín. Trypsín úr Atlantshafsporski var hreinsað á *p*-amínóbenzamidín sérvirkri súlskilju og Mono Q jónaskiptasúlu. Nokkur afbrigði af ensíminu koma fram í jónaskiptagreiningunni. Mest er af trypsín I afbrigðinu og var sjálfmelta þess rannsökuð. Raðgreining á trypsíni I sýnir að hluti ensímsins er rofinn við lýsín 154 en það breytir ekki rástíma þess á jónaskiptasúlunni. Sjálfmelta á sér stað meðan á jónaskiptagreiningunni stendur og verður sértækt rof við argínín 74 en við það breytist rástími ensímsins á súlunni. Eftir geymslu trypsíns I í lausn við 30°C var peptíðbútum safnað af vatnsfælniskilju til amínóendaraðgreininga. Átta mögulegir sjálfmelturofstaðir greindust. Þegar 114 af 222 amínósýrum ensímsins hafa nú verið raðgreindar benda niðurstöður til að trypsín I sé sama afbrigðið og cDNA klón úr Atlantshafsporski, sem einnig er nefnt trypsín I [A. Gudmundsdóttir et al., Eur. J. Biochem. 217 (1993) 1091-1097]. Niðurstöður benda til að við 30°C einskorðist sérvirkni trypsíns I úr þorski ekki við rof við argínín eða lýsín.

Inngangur

Meltingarensímið trypsín flokkast til sérín próteasa en þeir hvata vatnsrof á peptíðtengjum í próteinum og peptíðkeðjum. Sérvirkni trypsíns takmarkast að jafnaði við peptíðtengi sem hafa amínósýrurnar argínín (R) eða lýsín (K) amínómegin við tengið [1].

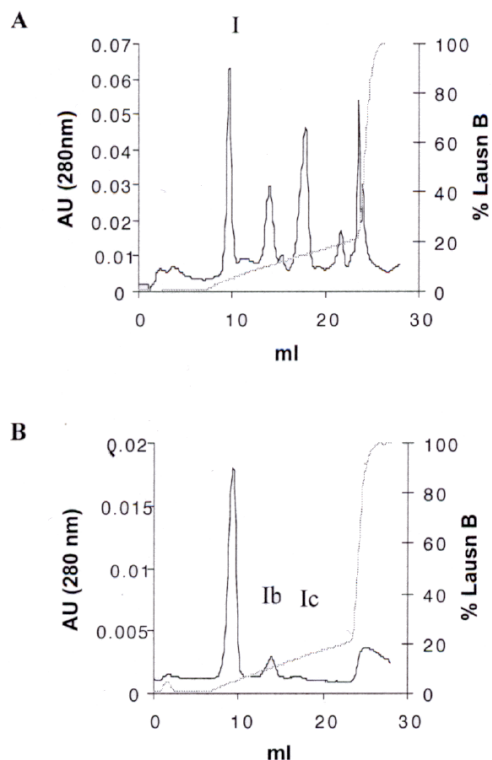
Trypsín úr Atlantshafsporski flokkast til kulda-virkra ensíma. Þau hafa almennt meiri hvötunargetu en sambærileg ensím úr spendýrum en stöðugleiki þeirra er aftur á móti minni. Þessi aukna hvötunargeta og óstöðugleiki eru talin stafa af sveigjanlegri byggingu [2–4]. Lýst hefur verið aðgreiningu á sjö afbrigðum trypsína úr þorski á jónaskiptaskilju en skyldleiki afbrigðanna er ekki þekktur og eiginleikar þeirra hafa aðeins að litlu leyti verið skilgreindir [5]. Þrjú trypsíngen hafa fundist í genasafni úr þorski. Þau skrá öll fyrir einni samfelldri keðju úr 222 til 227 amínósýrum. Afurðir genanna eru trypsínforverar sem virkjaðir eru með peptíðrofi við argínín 15 [6, 7]. Próteasar geta í mörgum tilvikum hvatað eigið vatnsrof, þ.e. rof á eigin peptíðtengjum (sjálfmeltu), sem getur leitt til óvirkjunar próteinsins [8, 9]. Kuldavirk trypsín gætu verið viðkvæmari fyrir sjálfmeltu en ensím sem aðlöguð eru að hærri hitastigi vegna sveigjanlegri byggingar og meiri hvötunargetu.

Tilgangur rannsókna sem hér er lýst var að kanna hvort sjálfmelta ætti sér stað þegar trypsín I úr þorski er geymt í lausn og þá á hvaða stöðum ensímið er viðkvæmast fyrir vatnsrofi. Einnig var kannað hvort skýra megi tilvist einhverra af afbrigðunum sem greinast á jónaskiptasúlu með því að þau séu niðurbrotsafurðir af öðrum afbrigðum.

Niðurstöður og umræða

Skúflangar úr Atlantshafsporski voru klipptir upp og þeim blandað við 100 mM Tris-HCl lausn, 5 mM CaCl₂, pH 8,2. Eftir skilvindun var trypsín einangrað á *p*-amínóbenzamidín-Sepharose 6B sértækri skilju [2]. Trypsín var greint í afbrigði með þáttun á Mono Q HR 5/5 jónaskiptaskilju. Notaður var 20 mM Tris-HCl buffer með 5 mM etanólámín og 10 mM CaCl₂, pH 9,0, við stofuhita. Trypsín var losað af súlunni með 0-180 mM NaCl saltstyrkhalla í 18 ml, með flæðihraða 1 ml/mín. Með þessari aðferð koma þrjár vel aðgreindir trypsíntoppur fram (sjá mynd 1A). Fremsti toppurinn hefur verið skilgreindur sem trypsín I. Aðferðin gefur góða aðgreiningu á trypsíni I frá öðrum afbrigðum og var hún notuð til að hreinsa það í nægilegu magni fyrir þessa rannsókn.

Til að ganga úr skugga um að trypsín I væri hreint eftir greiningu á Mono Q súlu var toppnum

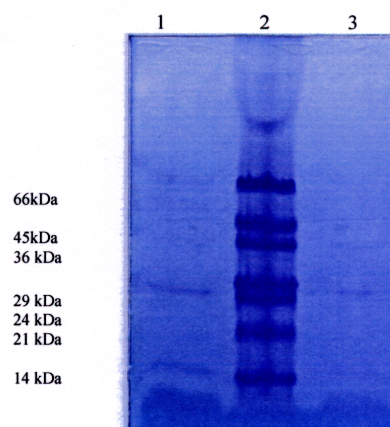


Mynd 1. (A) Hreinsun trypsíns I á Mono Q jónaskipta-skilju. Súlan var undirbúin með 20 mM Tris-HCl, 5 mM etanólamín og 10 mM CaCl₂, pH 9,0. Trypsín voru losuð af með línulegum 0-180 mM NaCl saltstigli. Svarta línan táknar gleypni við 280 nm og grúa línan er mældur styrkur stigulsins. **(B)** Greining á trypsíni I endurtekin við nákvæmlega sömu aðstæður og á mynd 1A.

sem svaraði til trypsíns I safnað, sýninu var hlaðið aftur á súluna og greiningin endurtekin. Við endurteknu greininguna komu fram þrjár vel aðgreindir toppar (mynd 1B). Trypsín I kom af súlunni við 9 ml eins og í fyrri greiningunni en þar að auki birtust tveir litlir toppar við 13,5 og 17 ml en þar voru einnig toppar með trypsínvirkni í fyrri greiningunni. Í fremri toppunum tveimur var trypsínvirkni, en virkni í þriðja toppnum var undir greiningarmörkum mæliaðferðarinnar (<0,01 U/ml). Nýju topparnir tveir voru kallaðir trypsín Ib og Ic. Trypsín Ib og Ic voru það vel aðgreind frá trypsíni I að útilokað var að um mengun úr jöðrum toppsins úr fyrri greiningunni væri að ræða. Því hljóta þessi trypsínform að hafa myndast frá því að sýninu af trypsíni I var safnað og þar til síðari greiningunni var lokið. Ætla má að um sé að ræða sjálfmeltuafurðir sem loða fastar við Mono Q súluefnið en trypsín I.

Til að varpa ljósi á skyldleika trypsíns I við trypsín Ib voru bæði afbrigðin amínósýruraðgreind. Ekki reyndist nægilegt próteinmagn í toppi Ic til að

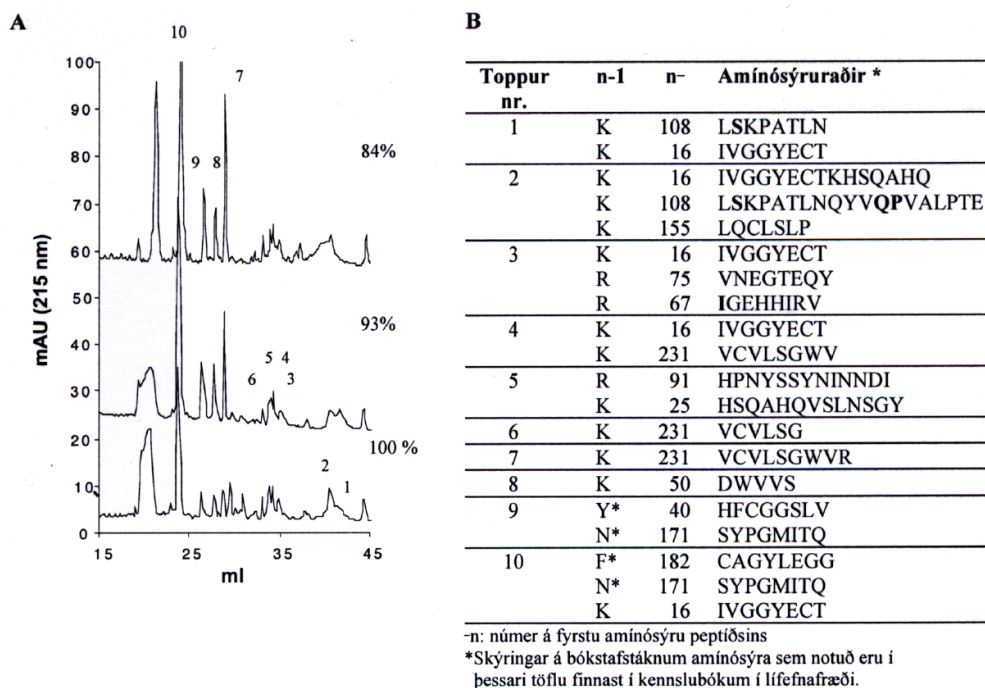
hægt væri að greina innihald hans. Tveir amínóendur greindust í sýnum úr báðum toppunum. Í báðum sýnum greindist röðin ¹⁶Ile-val-gly-gly-tyr-gly-cys-thr-lys-his, sem svarar til amínóenda trypsíns I. Í fremsta toppnum (trypsín I, við 9 ml) greindist einnig rof við leusín 155 en sú amínósýra er næst á eftir lýsínu í lykku á yfirborði próteinsins. Rafdráttargreining á nýhreinsuðu trypsíni I sýndi að órofið ensím finnst einnig í fremsta toppnum (mynd 2). Þannig hafa trypsín I sem er rofið við lýsín



Mynd 2. SDS rafdráttur á trypsíni I. Rás 1: Nýhreinsað trypsín I af Mono Q súlu. Rás 2: mólmassastaðlar. Rás 3: trypsín I með 93% virknileif eftir geymslu við 30°C. Trypsínsýnin voru TLCK hindruð, afoxuð og karboxymethyleruð og rafdrengin á 8-25 polyakrílamíð hallandageli.

154 og órofið trypsín I sama rástíma á Mono Q skilju með þessari greiningaraðferð. Í trypsín Ib sýnum greindust hins vegar peptíðrof við valín 75 sem kemur á eftir argínínu í röðinni og er því mögulegur rofstaður fyrir trypsín. Þannig virðist trypsín I hafa verið rofið við argínín 74 meðan á jónaskipta-skiljunni stóð. Við þetta rof breytast viðlöðunar-eiginleikar trypsínsins við Mono Q súluna og nýr toppur fæst (trypsín Ib). Þessar niðurstöður benda til þess að toppurinn með rástíma 13,5 mínútur sé trypsín I sem hefur verið rofið við argínín 74. Þrátt fyrir rofið helst ensímið virkt. Þessar niðurstöður benda til þess að toppurinn við 13,5 ml í Mono Q greiningunni sé í raun niðurbrotsafurð úr trypsíni I en raðgreina þyrfti prótein úr sýnum úr fyrri Mono Q greiningunni til að staðfesta það.

Frekari stuðningur fyrir sjálfmeltu á Mono Q skiljunni fékkst þegar skoðaðar voru trypsínheimtur sem fall af fjölda virknieininga sem á súluna fóru. Niðurstöður leiddu í ljós að eftir því sem meiru af virku ensími var hlaðið á súluna því



Mynd 3. (A) rpHPLC greining sýna af hreinsuðu trypsíni I, sem geymd höfðu verið við 30°C. Sýni með 100, 93 og 84% af upphafsvirkninni voru TLCK hindruð, afoxuð og alkyleruð áður en þau voru greind. Súlan var undirbúin með 0,1% TFA í vatni. Losað var af súlunni með 0-70% acetonitríli í 0,1% TFA. Toppur merktir 1-10 voru N-enda raðgreindir. **(B)** Niðurstöður úr N-enda raðgreiningu á peptíðum sem mynduðust við sjálfmeltu trypsíns I. Notast er við eins bókstafs tákna fyrir aminósýrurnar. Aminósýrur merktar með stjörnu gefa til kynna rofstaði sem ekki eru sérhæfðir trypsín rofstaðir. Þær aminósýrur sem eru feitlettraðar hafa ekki samsvörun við útgefna aminósýruröð trypsíns I (sjá umfjöllun í texta) [6].

minni ensímvírkni skilaði sér hlutfallslega af súlunni. Þannig fengust 5 virknieiningar af súlunni þegar 10 virknieiningum var hlaðið á hana (50% heimtur), 95 einingar gáfu 24% heimtur og 155 einingar aðeins 18% heimtur. Líkleg skýring á því hversu fáar virknieingar skila sér þegar mjög þéttum sýnum er hlaðið á Mono Q súluna, er að sjálfmelta eigi sér stað í sífellt auknum mæli með vaxandi styrk trypsíns.

Enn er ekki vitað hvenær rofið við lýsín 154 á sér stað. Með SDS-rafdráttargreiningu hefur sést að nýhreinsað trypsín af *p*-aminóbenezamidín skilju inniheldur próteínkeðjur af svipaðri stærð og myndast við rof við lýsín 154. Þannig er líklegt að rof á þessum stað verði áður en að jónaskiptaskiljunni kemur í próteinhreinsuninni. Engu að síður er mögulegt að það gerist meðan trypsín I er bundið við Mono Q súluna.

Sjálfmelta var einnig skoðuð með því að geyma trypsín I í 20 mM Tris, 5 mM etanolámín, 10 mM CaCl₂, pH 9,0 við 30°C. Í upphafi var virkni mæld, hún skilgreind sem 100% virkni, og sýn-

ið strax hindrað með TLCK. Til að greina fyrstu sjálfmeltustaði voru sýni einnig tekin þegar virkni hafði minnkað um 7% og aftur eftir 16% minnkun á virkni og voru þau hindruð á sama hátt strax að lokinni virknimælingu. Þegar upphafssýnið var greint á SDS hlaupi fengust þrjú bönd sem höfðu staðsetningu samsvarandi 27 kDa, 12 kDa og 15 kDa að mólmassa (sjá mynd 2).

Þessar niðurstöður voru mjög í samræmi við þær sem fengust úr raðgreiningum á trypsíni I. Hluti sameindanna í lausninni er órofin 27 kDa keðja, en í lausninni eru einnig trypsínsameindir sem eru rofnar við lýsín 154. Roft við lýsín 154 skiptir einmitt trypsíni í tvo búta sem eru u.þ.b. 10 og 15 kDa á stærð.

Tvísúlfiðtengi TLCK hindruðu ensím-sýnanna voru rofin og útbúnar acetylamíð afleiður af þeim áður en peptíðin sem myndast höfðu við sjálfmeltuna voru greind á HPLC vatnsfælniskilju. Á mynd 3 sést að þegar trypsín I (100% virkni) var greint á vatnsfælniskilju komu fram margir toppar. Á grundvelli niðurstaðnanna sem lýst er hér að framan um

nýhreinsað trypsín I hefði mátt búast við þremur toppum úr þessu sýni, óklipptu próteini, auk búta-anna tveggja sem myndast við rof við lýsín 154. Niðurstöðurnar sem sjást á mynd 3A benda til þess að nýhreinsaða trypsínið sem notað var í þessari tilraun hafi verið rofið á miklu fleiri stöðum. Þessir peptíðbútar gætu hafa myndast meðan á hreinsun ensímsins stóð eða meðan sýnið var meðhöndlað fyrir vatnsfælniskiljuna. Samanburður á peptíðmynstri trypsínsýna með 100% virkni, og sýnanna sem misst hafa 7% og 16% af virkni sinni sýnir, að sumir toppar breyta um lögun og aðrir toppar hækka með minnkandi virkni. Það bendir til að sjálfmelta hafi átt sér stað (sjá mynd 3A). Ólíklegt verður að teljast að breytingar á toppunum eigi sér aðrar skýringar en sjálfmeltu vegna þess að sýnin eru eins að öllu leyti nema að þau hafa dvalið mislangan tíma í 30°C hitabaði.

Niðurstöður raðgreininga á amínóenda peptíða sem merkt eru 1-10 á mynd 3A sjást á mynd 3B. Við peptíðgreiningu með vatnsfælniskilju koma þau peptíð sem eru vatnsfælnust síðast af súlunni. Þetta eru að jafnaði stærstu peptíðin. Þess vegna er líklegast að peptíðin sem greinast undir toppum 1 og 2 sýni fyrstu staðina sem rofna við sjálfmeltu. Auk amínóendans, ¹⁶ile-val-gly-gly-tyr-glu-cys, finnast í þessum toppum amínóendar sem hafa myndast við rof við lýsín 107 og lýsín 154. Á grundvelli þessarar niðurstaðna, og þess að ensím, sem rofið er við lýsín 154 finnst í nýhreinsuðum trypsín I sýnum, er líklegt að lýsín 154 sé fyrsti rofstaður í sjálfmeltu á trypsíni I. Aðrir trypsín rofstaðir sem komu fram við raðgreiningarnar voru: lýsín 24, lýsín 49, argínín 66, argínín 74, argínín 90 og lýsín 230.

Undrun vekur að tveir af rofstöðunum sem komu fram við raðgreiningarnar, histidín 40 og cysteín 182, eru karboxylmegin við amínósýrurnar tyrosín og fenýlalanín, en rof við þessar amínósýrur tengist sérvirkni chymotrypsíns. Einnig greinist í tveimur toppum rofstaður karboxylmegin við asparagín. Toppur nr. 9 og 10, sem innihalda þessi peptíð vaxa að hæð eftir því sem meiri trypsinvirkni tapast í þessari geymslutilraun við 30°C. Eftir hreinsun á sértækri trypsínskilju og á Mono Q skilju, sem aðgreinir einstök afbrigði af trypsíni er ekki líklegt að trypsín I sýnin séu menguð af chymotrypsíni. Því er ástæða til að ætla að trypsín I, þrátt fyrir sína meintu þröngu sérvirkni, sé við þessar aðstæður fært um að rjúfa á stöðum sem ekki eru dæmigerðir fyrir ensímið. Prófanir hafa sýnt að í trypsínsýnum sem fást við hreinsun á sérvirkri skilju er ensímvirkni til að hvetja rof á hvarfefnum sem venjulega eru notuð við mælingar á chymotrypsínvirkni. Þegar sértæka chymotrypsín-

hindranum tosyl-phenylalanine-chloromethyl ketón (TPCK) er bætt í þessi sýni minnkar virkni gagnvart trypsínhvarfefni og chymotrypsínhvarfefni jafnmikið, eða um 20%. Þessar niðurstöður benda til þess að hæfni til að hvetja rof á þessum tveimur gerðum hvarfefna búi í sömu gerð af sameindum og að trypsín úr þorski búi yfir breiðari sérvirkni en trypsín sem áður hafa verið rannsökuð. Amínósýruraðirnar sem sýndar eru á mynd 3B svara til um 50% af amínósýruröð trypsíns I. Þær amínósýrur sem eru feitlettraðar á mynd 3B eiga ekki amínósýrusamsvörun við útgefna trypsín I cDNA röð [6]. Því var cDNA röð trypsíns I raðgreind aftur og í ljós kom að þrjár af fjórum amínósýrum sem ekki voru í samræmi við amínósýruraðgreiningu á trypsíni I voru rangt greindar í útgefni trypsín I cDNA röð frá 1993. Hins vegar er enn óvissa um amínósýru nr. 67.

Niðurstöður rannsókna benda til þess að a.m.k. eitt eða tvö afbrigði trypsíns sem greinast á jónaskiptasúlu séu sjálfmeltuafurðir trypsíns I. Önnur afurðin myndast við rof við lýsín 154 en hin við argínín 74 en við þessi rof hverfur ekki virkni próteinsins. Niðurstöðurnar sýna ennfremur að trypsín getur hvatað rof á öðrum trypsínsameindum á fjölmörgum stöðum, og að sérvirkni trypsíns I úr þorski er þannig að rofstaðir chymotrypsíns eru ekki óhultir.

Summary: Trypsin is a digestive serine protease which catalyzes hydrolytic cleavage of peptide bonds adjacent to arginines or lysines. Trypsin from Atlantic cod was purified using *p*-aminobenzamide affinity chromatography and Mono Q ion exchange chromatography. Several variants of the enzyme are separated in the second purification step. Trypsin I is in greatest abundance and autolysis of this variant was studied. Amino terminal sequencing shows that a fraction of trypsin I is cleaved at lysine 154 but this does not alter the retention time of the enzyme on the Mono Q column. A specific hydrolysis at arginine 74 occurs while trypsin I is bound to the Mono Q matrix and this cleavage alters its retention time. After incubation of trypsin I in solution at 30°C, peptide fragments generated by autolysis were separated on reverse phase HPLC and sequenced. At least eight autolysis sites were identified. With the current data 114 out of 222 amino acid residues of trypsin I have been sequenced. The protein appears to be homologous to the cod trypsin cDNA sequence, also termed trypsin I [A. Gudmundsdóttir et al., Eur. J. Biochem. 217 (1993) 1091-1097]. Analysis of peptides generated by autolysis in solution indicates that the specificity of trypsin I is not entirely limited to peptide bonds adjacent to arginine or lysine at 30°C.

Heimildir

- [1] S. Halfon and C.S. Craik, in: *Handbook of proteolytic enzymes*, ed A.J. Barrett, N.D. Rawlings and J.F. Woessner, Academic press. San Diego. California, 1998.
- [2] B. Ásgeirsson, J.W. Fox and J.B. Bjarnason, *Eur. J. Biochem.* **180** (1989) 85.
- [3] C. Gerday, M. Aittaleb, J.L. Arpigny, E. Baise, J.P. Chessa, G. Garsoux, I. Petrescu and G. Feller, *Biochim. Biophys. Acta* **1342** (1997) 119.
- [4] C. Gerday, M. Aittaleb, M. Bentahir, J.P. Chessa, P. Claverie, T. Collins, S. D'Amico, J. Dumont, G. Garsoux, D. Georgette, A. Hoyoux, T. Lonhienne, M.A. Meuwis and G. Feller, *Trends in Biotechnol.* **18** (2000) 103.
- [5] E. Briem, M.S ritgerð. Háskóli Íslands, 2000.
- [6] A. Guðmundsdóttir, E. Guðmundsdóttir, S. Óskarsson, J.B. Bjarnason, A.K. Eakin and C.S. Craik, *Eur. J. Biochem.* **217** (1993) 1091.
- [7] R. Spilliaert and Á. Guðmundsdóttir, *Mar. Biotechnol.* **1** (1999) 598-607.
- [8] A. Murphy and C.O. Fagain, *J. Biotechnol.* **49** (1996) 163.
- [9] Z. Yang, M. Domach, R. Auger, F.X. Yang and A.J. Russell, *Enz. Microbial Technol.* **18** (1996) 82.

Um höfundana: Linda Helgadóttir er lífefnafræðingur á lífefnafræðistofu Raunvísindastofnunar.

Sigríður Ólafsdóttir er verkefnisstjóri hjá Lyfjaþróun h.f. Jay W. Fox er prófessor við örverufræðideild Háskóla Virginíu.

Jón Bragi Bjarnason er prófessor í lífefnafræði við Háskóla Íslands.

¹Lífefnafræðistofu, Raunvísindastofnun Háskólans,
Dunhaga 3,

107 Reykjavík
²Department of Microbiology,
School of Medicine,
University of Virginia, USA

`linda@hi.is`

Móttakin: 10. desember 2003

